

# No title available

Publication number: JP5268954 (A)

Publication date: 1993-10-19

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:


- international: C12N9/52; C12R1/64; C12N9/52; (IPC 1-7): C12N9/52; C12N9/52; C12R1/64

- European:

Application number: JP19920090135 19920317

Priority number(s): JP19920090135 19920317; JP19910084324 19910326

Also published as:

 JP7048996 (B)

## Abstract of JP 5268954 (A)

PURPOSE:To obtain an alkaline protease utilizable for processing foods, industry, a detergent, etc., for the purpose of hydrolyzing proteins within a low- temperature region. CONSTITUTION:The objective alkaline protease is produced by culturing a strain of the genus Xanthomonas, specifically Xanthomonas sp. S-1 (FERM P-12087) culturable at a temperature within the range of 10-20 deg.C in a nutrient culture medium. This alkaline protease has about 40 deg.CC optimum temperature, but the activity even within the low temperature region. Furthermore, the objective method for producing the alkaline protease is provided.

.....  
Data supplied from the *espacenet* database ---- Worldwide

特開平5-268954

(43)公開日 平成5年(1993)10月19日

|                          |      |         |     |        |
|--------------------------|------|---------|-----|--------|
| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 9/52             |      | 7823-4B |     |        |
| // (C 1 2 N 9/52         |      |         |     |        |
| C 1 2 R 1:64)            |      |         |     |        |

審査請求 有 請求項の数3(全15頁)

(21)出願番号 特願平4-90135

(22)出願日 平成4年(1992)3月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年3月15日  
 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌65巻  
 03号」に発表

(71)出願人 000241968

北海道糖業株式会社  
 東京都千代田区神田神保町2丁目1番地

(72)発明者 柴田 知彦

北海道網走市潮見1-358-32

(72)発明者 松田 久男

北海道中川郡本別町勇足38-6

(72)発明者 堀 平

北海道北見市北上101-15

(72)発明者 鈴木 英雄

北海道網走市南7条東3丁目

(74)代理人 弁理士 田中 昭雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なアルカリプロテアーゼとその製造方法

(57)【要約】

【目的】 低温領域で、蛋白質分解を目的とする食品加工用、工業用、洗剤用等に利用可能なアルカリプロテアーゼを提供することを目的とする。

【構成】 10～20℃の温度領域で培養可能な菌株・キサントモナス属、具体的にはキサントモナス・エスピー(Xanthomonas sp.)S-1(微工研寄託菌寄第12087号)を栄養培地にて培養することにより、至適温度は40℃前後であるが、低温領域でも活性を有するアルカリプロテアーゼとその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼ

- (1) 作用：高アルカリ条件下で各種の蛋白質を分解する。
- (2) 基質特異性：難溶性蛋白質、特にツェインに対して特異性を示す。
- (3) 至適pH：pH10.5～12である。
- (4) 安定pH範囲：相対活性90%以上としたときpH7～12である。
- (5) 至適温度：温度45℃である。
- (6) 耐熱性：pH10.5で30℃迄活性を維持する。
- (7) 吸収スペクトル：pH8.0の50mMトリス塩酸緩衝液中において紫外領域275 nmに極大吸収を示す。
- (8) 金属イオンの影響：Caイオンで活性の熱安定性が増す。
- (9) 阻害剤の影響：イソプロピルフルオロン酸（DFP）、フェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）による活性の阻害が、エチレンジアミンテトラアセテート-2Na（EDTA-2Na）、P-クロロマーキュリー安息香酸（PCMB）による活性阻害に比べて高い。
- (10) 分子量：36000（ゲル濾過法）
- (11) 等電点：9.1（エレクトロフォーカシング法）

【請求項2】 キサントモナス属の菌株を栄養培地に培養し、培養物中にアルカリプロテアーゼを蓄積せしめ、該培養物からアルカリプロテアーゼを採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼの製造方法。

【請求項3】 キサントモナス属の菌株が、キサントモナス・エスピー（*Xanthomonas* sp.）S-1（微工研寄託 菌寄第12087号）であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、新規なアルカリプロテアーゼとその製造方法に関し、更に詳しくはキサントモナス属の一菌株を培養することによって生産され、アルカリ条件下、比較的低温度（室温～約40℃）にても酵素活性を有する細菌アルカリプロテアーゼとその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アルカリプロテアーゼは、バチルス属、ストレプトマイセス属、アスペルギルス属等の微生物を利用して生産されるものが知られている。

【0003】このアルカリプロテアーゼは、食品加工、洗浄剤、皮革工業等の分野に利用されているだけでなく、フィルムからの銀回収、醸造工業等の分野でも広く使用されている。

【0004】ところで、近年食肉の軟化剤、洗浄剤を始めとして低温もしくは室温でアルカリプロテアーゼを使

用する分野が増大しており、これに伴って低温もしくは室温で使用できるアルカリプロテアーゼと、低温もしくは室温で有効に増殖するアルカリプロテアーゼ生産菌の開発が期待されている。

【0005】

【発明が解決しようとする問題点】しかし、従来のアルカリプロテアーゼは至適温度が高く、耐熱性に特徴があり、現在、より低温で活性を有するアルカリプロテアーゼとして市販されているアルカリプロテアーゼ（商品名APJ-21：昭和電工製）についても、低温領域における活性は必ずしも満足できるものでない。

【0006】この発明は、低温領域において充分な酵素活性を有するアルカリプロテアーゼとその製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【問題点を解決するための手段】本発明者らは、低温領域で充分な洗浄効果を有するアルカリプロテアーゼの生産、更に低温培養で効率よくアルカリプロテアーゼを生産させる方法について鋭意研究を重ね、広く自然界よりアルカリプロテアーゼ生産菌を検索した結果、キサントモナス属に属する一菌株が、前記性質において優れたアルカリプロテアーゼを培地中に生産することを見出し、この発明を完成するに至ったものである。

【0008】即ち、従来の菌株では一般に酵素の生産は30℃以上の培養温度が普通であるが、この発明のキサントモナス菌株は10～25℃の温度領域で培養され、15℃の培養温度でアルカリプロテアーゼの生産が最大となり、低温領域で活性を有するアルカリプロテアーゼが得られる。

【0009】この発明のアルカリプロテアーゼを生産する分離菌株の菌学的性質について、以下に示す。

A. 形態的性質

肉汁寒天培地上で30℃、2日間培養した時、以下の形態的特徴が観察された。

- |          |           |
|----------|-----------|
| 1) 細胞の形  | ：桿菌       |
| 大きさ      | ：—        |
| コロニーの大きさ | ：直径 0.5mm |
| 2) 運動性   | ：有り       |
| 3) 胞子    | ：形成されない   |
| 4) グラム染色 | ：陰性       |

【0010】B. 生理的性質

- |                 |    |
|-----------------|----|
| 1) 硝酸塩の還元       | ：— |
| 2) インドール生成      | ：— |
| 3) アルギニンデヒドロラーゼ | ：— |
| 4) ウレアーゼ        | ：— |
| 5) β-ガラクトシダーゼ   | ：+ |
| 6) オキシダーゼ       | ：— |
| 7) カタラーゼ        | ：+ |
| 8) ゼラチンの加水分解    | ：+ |
| 9) ツィーン80の加水分解  | ：— |

- 10) OFテスト : -  
 11) 生育の温度範囲 : 37℃以上  
 12) グルコースからの酸生成 : -  
 13) マルトースからの酸生成 : -  
 14) 糖類及び有機酸の消化性
- |        |     |        |     |
|--------|-----|--------|-----|
| グルコース  | : + | カプロン酸  | : - |
| アラビノース | : - | マレイン酸  | : + |
| マンニット  | : - | クエン酸   | : + |
| マルトース  | : + | フェニル酢酸 | : - |
| マンノース  | : + | アジピン酸  | : - |
| グルコン酸  | : - |        |     |

【0011】以上の菌学的性質からこの菌株は、キサントモナス属に属するとみなされる。したがって、本菌株をキサントモナス・エスピー(*Xanthomonas* sp.) S-1 と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した。寄託番号は微工研寄託 菌寄第12087 号である。

【0012】この発明に使用する微生物としては、上記キサントモナス・エスピー(*Xanthomonas* sp.) S-1(微工研寄託 菌寄第12087 号)が挙げられるが、この菌だけに限らずキサントモナス属に属し低温領域でアルカリプロテアーゼを生産する菌は全てこの発明において使用することができる。

【0013】この発明においてアルカリプロテアーゼを生産する培地としては、通常の微生物の培養に用いられるもので、本菌株に利用可能なものであれば良く、炭素源としてはデンプン、デキストリン、糖蜜、グルコース、無機塩としてはリン酸2ナトリウム、硫酸マグネシウム等の塩類や炭酸塩を加えてアルカリ性培地が好ましく、窒素源としては硝酸ナトリウム、尿素、有機窒素源等が使用される。

【0014】培養温度は10~25℃の範囲にあり、好ましくは12~17℃である。培養pH7.0~9.0の範囲にあり、好ましくはpH8.2~8.7である。但し、この条件に限定されるものではない。培養は通常48~96時間培養することにより、培養液中にアルカリプロテアーゼが蓄積される。

【0015】培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過などの一般的な固液分離手段により菌体及び不溶物を除いて粗酵素液を得る。このようにして得られた粗酵素液を硫酸塩析によりアルカリプロテアーゼを得る。このままで使用するか、更に透析、有機溶媒分別法、カラムクロマト等公知の精製法により精製しても良い。

【0016】この発明に係るアルカリプロテアーゼの単離精製方法の一例を、図1に示す。これによれば先ず、微生物培養液を遠心分離してその上清を硫酸塩析にかけ、得られた沈殿物をリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し、同緩衝液にて透析する。

【0017】次にこの溶液を疎水クロマトグラフィーにかけ、硫酸(14~0%)を含むリン酸緩衝液で溶出し、活性画分を集め、得られた活性画分をリン酸緩衝液(pH

7.0)にて透析する。

【0018】この透析液をカチオン交換クロマトグラフィーにかけ、リン酸緩衝液で洗浄後、塩化ナトリウム(0~0.3M)を含む同緩衝液で溶出し、活性画分を集め、更にこの溶液をトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で透析後、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、同緩衝液で溶出させ、活性画分を集める。

【0019】最後に、この溶液をSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を用いないポリアクリルアミド電気泳動にかけ、活性画分を切り出し核酸蛋白回収器マックスーールドーNPにて抽出、精製されたアルカリプロテアーゼ(以下、S酵素と称す)を得る。

【0020】得られたアルカリプロテアーゼの物理化学的性質は次の通りである。

- (1) 作用：高アルカリ条件下で各種の蛋白質を分解する。
- (2) 基質特異性：難溶性蛋白質、特にツエインに対して特異性を示す。
- (3) 至適pH：pH10.5~12である。
- (4) 安定pH範囲：相対活性90%以上としたときpH7~12である。
- (5) 至適温度：温度45℃である。
- (6) 耐熱性：pH10.5で30℃迄活性を維持する。
- (7) 吸収スペクトル：pH8.0の50mMトリス塩酸緩衝液中において紫外領域275nmに極大吸収を示す。
- (8) 金属イオンの影響：Caイオンで活性の熱安定性が増す。
- (9) 阻害剤の影響：イソプロピルフルオロン酸(DFP)、フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)による活性の阻害が、エチレンジアミンテトラアセテート-2Na(EDTA-2Na)、パークロロマーキュリー安息香酸(PCMB)による活性阻害に比べて高い。
- (10) 分子量：36000(ゲル濾過法)
- (11) 等電点：9.1(エレクトロフォーカシング法)

【0021】以上で明らかなように、この発明によれば比較的低温領域で活性なアルカリプロテアーゼをキサントモナス属の菌株より低温培養で効率よく生産することができる。

## 【0022】

【実施例】以下、実施例によりこの発明を具体的に説明する。

### 実施例1

#### (a) 菌株の培養

カゼイン0.5%、グルコース0.5%、酵母エキス0.2%、リン酸ナトリウム0.6%、塩化カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.01%を120℃にて20分間滅菌した後、滅菌済の0.1M炭酸ナトリウム緩衝液(pH10.5)を最終濃度0.25%となるように加え、初発pHを8.5に合わせ培養液を調整した。該培養液5mlを試験管(Φ18×180mm)に分注し、キ

サントモナスエスピー(Xanthomonas sp.)S-1株を接種し、該培養液を15℃で20時間好氣的に振盪培養し、種培養液を調整した。該種培養液を同じ組成の培地各100mlの入った500ml コルベン10本に加え15℃で72時間好氣的に振盪培養した。得られた培養液1000ml (270PU/ml)を遠心分離により除菌し、上清を得た。

#### 【0023】(b) 酵素の精製

このようにして得られた培養上清を冷却攪拌しながら70% 飽和度になるように硫酸を添加すると、アルカリプロテアーゼが析出した。該沈殿物を遠心分離により回収し、該沈殿物を10mMリン酸緩衝液(pH6.0)50mlに溶解し、該溶液を透析膜に入れ、同緩衝液にて透析した。ここに70mlの粗酵素液(270PU/ml, 比活性490PU/mg-タンパク)を得た。得られた透析液に硫酸を14% 濃度になるように添加し、硫酸14%を含む同緩衝液で平衡化したブチルTOYOPEARL650(東ソー社製)を充填したカラムに該溶液をかけ、疎水クロマトを行い、活性画分を集めたところ全量は、310ml、活性は、500PU/ml、比活性は、2270PU/mg-タンパクであった。

【0024】ここまでの精製度は、10倍、回収率は、60%

であった。次に、該活性画分を20mMリン酸緩衝液(pH7.0)で透析を行い、同緩衝液で平衡させたCM-セファデックスC-50(ファルマシア社製)を充填したカラムに該溶液を展開させ、同緩衝液で比吸着分を溶出させ吸着分を塩化ナトリウム(0~0.3M)を含む同緩衝液で溶出させ、活性画分を集めたところ全量は70ml、活性は1500PU/ml、比活性は、2500PU/mg-タンパクであった。ここまでの精製度は、11倍、回収率は、41%であった。

【0025】更に、該活性画分を濃縮し50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で透析を行い、該溶液をセファデックスG-75(ファルマシア社製)のゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、同緩衝液で展開させた。得られた活性画分をSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を用いないポリアクリルアミド電気泳動にかけ、活性画分を切り出し核酸蛋白回収器マックスイールド-NPにて抽出し、活性4400PU/ml、比活性3150PU/mg-タンパクの溶液4mlを得た。この精製過程を下記表1に示す。

#### 【0026】

【表1】

表1

|           | 容量<br>(ml) | 活性<br>(PU/ml) | 比活性<br>(PU/mg-Protein) | 回収率 | 精製倍<br>率 |
|-----------|------------|---------------|------------------------|-----|----------|
| 培養上清      | 1000       | 270           | 225                    | 100 | 1        |
| 硫酸分画      | 70         | 2700          | 490                    | 70  | 2.2      |
| 疎水クロマト    | 310        | 500           | 2270                   | 60  | 10.1     |
| カチオン交換    | 70         | 1500          | 2500                   | 41  | 11.1     |
| ゲル濾過      | 30         | 2400          | 3000                   | 26  | 13.3     |
| マックスイールドー | 4          | 4400          | 3150                   | 7   | 14.0     |

【0027】次に、精製された酵素を試料としたゲル濾過クロマトグラフィーの溶出曲線を図2に示す。ここで、充填剤としてはセファデックスG-75を用い、溶出液には50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を用いて展開した。

【0028】また、精製された酵素を試料とした高速液体クロマトグラフィーの溶出曲線を図3に示す。ここで、機種はショーデックスKB804(昭和電工社製)カラムを装着した島津LC-6Aを用い、溶出液は50ml塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。

図2、図3より明らかなように、上記の精製によりこの発明に係る酵素(S酵素)は完全に精製された。

#### 【0029】(1) 紫外線スペクトル

50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で透析した上記試料の紫外線吸収スペクトルを図4に示す。これより明らかなように、この発明に係る酵素は275nmの波長で極大吸収を示す。

#### 【0030】(2) 分子量

精製した酵素について分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した。ここで、充填剤としてはセファデ

ックスG-75（ファルマシア社製）を用い、50mMトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）を溶出液とした。標準蛋白として、オボアルブミン〔分子量43000〕、キモトリプシンノーゲンA〔分子量25000〕、リボヌクレアーゼA〔分子量13700〕の蛋白を用いて検量線を作成した。この検量線を図5に示す。この方法によりこの発明に係る酵素の分子量は36000と決定した。

#### 【0031】（3）等電点

この発明に係る酵素の等電点をエレクトロフォーカシン

グ法で調べた。ここで、キャリアアンフォライトにBio-Lyte3/10アンフォライトを用いた。この方法によりこの発明に係る酵素の等電点は9.1と決定した。

#### 【0032】（4）公知酵素との比較

この発明に係る酵素の各種性状を公知のアルカリプロテアーゼと比較して表2に示す。

#### 【0033】

【表2】

表2

|        | S酵素                | A酵素 <sup>(1)</sup> | B酵素 <sup>(2)</sup> |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 生産菌    | キサントモナス<br>sp. S-1 | バチルス<br>リケニフォルミス   | バチルス<br>アルカロフィルス   |
| 至適pH   | 10.5～12            | 10.0～10.5          | 11.7～12.5          |
| 安定pH領域 | 7～12               | 5.5～11.5           | 5.5～10.0           |
| 至適温度   | 45℃                | 60℃                | 60℃                |
| 耐熱性    | < 35℃              | < 40℃              | < 50℃              |
| 安定化剤   | Caイオン              | Caイオン              | Caイオン              |
| 分子量    | 36000              | 27300              | 30000              |
| 等電点    | 9.1                | 9.4                | 9.4                |
| 酵素のタイプ | セリン<br>プロテアーゼ      | セリン<br>プロテアーゼ      | セリン<br>プロテアーゼ      |

(1) A酵素：商品名アルカラーゼ（ノボ社製）

E. L. スミスら、J. Biol. Chem., 243, 2181, (1968) より引用。

(2) B酵素：No. 221 (ATCC21522) より単離されたアルカリプロテアーゼ

K. ホリコシ、Agr. Biol. Chem. Vol. 35, No. 9, 1407, (1971) より引用。

#### 【0034】実施例2

普通寒天培地にキサントモナス・エスピー(Xanthomonas sp.) S-1(微工研寄託菌第12087号)を接種し、15℃で3日間培養する。次にミルクカゼイン1%、塩化カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.02%、グルコース1%、酵母エキス0.4%、リン酸2ナトリウム1.2%を含む液体培地を120℃にて20分間滅菌した後、別途滅菌した0.1M炭酸ナ

トリウム緩衝液(pH10.5)を容量比0.25%添加し、pH8.5の培養液を調製した。この培養液を500ml容振盪フラスコに100ml分注し、上記培養した種菌を1白金耳接種し、10℃、15℃、23℃、30℃の各温度で72時間振盪培養した。24時間ごとにpH、菌体濃度(OD<sub>500nm</sub>の吸光値)、酵素活性を測定し、各培養温度での最大菌体濃度値及び最大酵素活性値を下記表3に示す。

表3

| 培養温度 | 最大菌体濃度値             | 最大活性値   |
|------|---------------------|---------|
| (℃)  | (A <sub>660</sub> ) | (PU/ml) |
| 10   | 6.0                 | 285     |
| 15   | 5.8                 | 370     |
| 23   | 5.2                 | 160     |
| 30   | 5.1                 | 43      |

【0036】なお、アルカリプロテアーゼの酵素活性測定方法はアンソニー・萩原変法を用いる次の方法で行なった。30℃に保温した2%カゼイン溶液(pH10.5)1.0mlに適宜希釈した酵素1.0mlを加えて10分間反応させた後、トリクロロ酢酸混液4.0mlを加えて反応を停止させ、30℃20分間放置し、東洋濾紙No.6で濾別後、濾液1.0mlに0.4M-炭酸ナトリウム溶液5.0mlを加え、これに5倍希釈したフォリン試薬1.0mlを加えて30℃で20分間放置し、660nmでの吸光度を測定する。前記条件下で1分間にチロシン1μg相当量を遊離させる酵素量を1単位(pu)とする。

【0037】以上表3に示した結果より明らかなように、キサントモナス・エスピー(Xanthomonas sp.) S-1(微工研寄託菌寄第12087号)では培養温度10～15℃程度の比較的低温の培養温度でアルカリプロテアーゼの最大活性値が得られた。

#### 【0038】実施例3

培養温度を15℃に設定する以外は実施例2と同じ条件で6本培養し、得られた培養液480mlを遠心分離により除菌し、上澄液460ml(350PU/ml)を得た。この上澄液に硫酸を加え70%飽和とし、アルカリプロテアーゼを析出さ

せ、遠心分離により塩析物を回収した。この塩析物を50mMトリス-HCl緩衝液(pH8.0)5mlに溶解し、該溶液を透析膜に入れ、該緩衝液にて1夜透析し、15mlの粗酵素液(8,050PU/ml)を得た。この粗酵素液を上記同様な精製方法で精製し、この精製された酵素を使用して、以下アルカリプロテアーゼの物理化学的性質を調べた。

【0039】(1)作用(アルカリ条件下における各種蛋白質の分解率)

測定条件 pH : 10.5(10mM ホウ砂-NaOH 緩衝液)

温度 : 30℃

反応条件: 30分間

基質濃度: 1%

酵素量 : 30PU/ml

蛋白質分解率の測定は、アンソニー・萩原変法に従い、各基質と所定の条件で反応させた後、直ちにBio-RadのProtein Assay Kitを用い蛋白質量を測定し、未反応分との比により分解率を求めた。その結果を下記表4に示すが、この表よりこの発明に係る酵素は、難溶性蛋白であるツエインをよく加水分解することが明らかである。

【0040】

【表4】

表 4

| カゼイン | ツェイン | 大豆蛋白 | ヘモグロビン |
|------|------|------|--------|
| (%)  | (%)  | (%)  | (%)    |
| 94.0 | 85.0 | 70.0 | 45.0   |

## 【0041】(2) 至適 pH 及び安定 pH 範囲

至適 pH は、カゼイン 1% を含む各 pH の緩衝液に酵素を 30PU/ml となるように加え、30℃ で 10 分間反応させ、各 pH における活性を測定することにより求めた。図 6 に至適 pH での活性を 100 とした時の各 pH での相対活性として示す。

【0042】また、安定 pH 範囲は各 pH の緩衝液に酵素を 210PU/ml となるように加え、15℃ で 24 時間インキュベートした後、30℃, pH10.5 で活性を測定することにより求めた。図 7 にインキュベート前の pH10.5 における活性を 100 とした時の相対活性として示す。なお、使用した緩衝液及びその pH 範囲は以下の通りである。

## 【0043】

| pH 範囲     | 緩衝液       |
|-----------|-----------|
| pH 3~7    | McIlvaine |
| pH 7~9    | トリス-HCl   |
| pH 9      | ホウ砂-HCl   |
| pH 10 ~12 | ホウ砂-NaOH  |

【0044】図 6、図 7 から明らかなように、至適 pH は 10.5~12 である。また、安定 pH 範囲は相対活性 90% 以上としたとき pH7 ~12 である。

## 【0045】(3) 至適温度及び耐熱性

至適温度は、基質として 1% カゼインを含む pH10.5 の緩衝液に酵素を加え、10 分間各温度で反応させ、活性を測定することにより求め、至適温度での活性を 100 とした時の各温度との相対活性を図 8 に示す。

【0046】耐熱性は、50mM トリス-HCl 緩衝液 (pH8.0) に 210PU/ml の酵素を加え、各温度で 5 時間熱処理し、氷冷した後、30℃, pH10.5 で活性を測定することにより求め、熱処理前の pH10.5 における活性を 100 とした時の相対活性として図 9 に示す。

【0047】 $\text{Ca}^{2+}$  塩添加 ( $\text{Ca}^{2+}$  塩添加量: 5mM) による耐熱性の向上を下記表 5 に示す。

## 【0048】

## 【表 5】



表 5

| 反応温度 (°C) | 相対性 (%)               |                       |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
|           | Ca <sup>2+</sup> 塩無添加 | Ca <sup>2+</sup> 塩5mM |
| 4         | 100                   | 100                   |
| 10        | 100                   | 100                   |
| 20        | 100                   | 100                   |
| 25        | 100                   | 100                   |
| 30        | 98                    | 100                   |
| 35        | 66                    | 96                    |
| 40        | 50                    | 88                    |
| 45        | 5                     | 77                    |
| 50        | 0                     | 54                    |

【0049】図8、図9から明らかなように至適温度は45℃であり、30℃の温度まで活性が維持される。更に、表4に示すごとくCa<sup>2+</sup>5mM添加により、耐熱性は約10℃向上した。

#### 【0050】(4) 金属イオンの影響

下記測定条件の下で各緩衝液に一定量の本酵素液を加え、各種金属塩を1mM添加25℃恒温槽で1時間保温後、酵素の残存活性を測定し、金属塩無添加の活性を100としたときの相対活性を下記の表6に示す。

#### 【0051】測定条件

- ① pH : 7.0 (20mM トリス-HCl 緩衝液)  
 ② pH : 10.5 (10mM ホウ砂-NaOH 緩衝液)  
 温度 : 30℃  
 反応時間 : 10分間  
 基質 : 1% カゼイン溶液 (各緩衝液で調整)

#### 【0052】

#### 【表6】

表 6

| 金属塩   | 相対活性 (%) |        |
|---|----------|--------|
|   | pH7.0    | pH10.5 |
| 無添加   | 100      | 100    |
| NaMoO <sub>4</sub>                              | 100      | 100    |
| Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>            | 100      | 100    |
| BaCl <sub>2</sub>                               | 100      | 100    |
| CoCl <sub>2</sub>                               | 100      | 100    |
| HgCl <sub>2</sub>                               | 88       | 6      |
| ZnSO <sub>4</sub>                               | 100      | 100    |
| CuSO <sub>4</sub>                               | 100      | 100    |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 100      | 100    |
| FeSO <sub>4</sub>                               | 100      | 100    |
| MnSO <sub>4</sub>                               | 100      | 100    |
| Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 88       | 100    |
| Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 13       | 92     |

【0053】表6より明らかなように、この発明に係る酵素液はpH7.0の条件で3価の鉄イオンに、pH10.5の条件で水銀イオンに強く活性を阻害される他は、他の金属イオンには活性を殆ど阻害されることはなかった。

【0054】(5) 阻害剤の影響

下記測定条件の下で20mMトリス-HCl緩衝液(pH7.0)にこの発明で得られた酵素液を加え、各阻害剤を所定濃度添加して25℃で30分間処理した後、酵素の残存活性を測定し、阻害剤無添加の活性を100としたときの相対活性を

下記表7に示す。

【0055】測定条件

pH : 7.0(20mMトリス-HCl 緩衝液)

温度 : 30℃

反応時間 : 10分間

基質 : 1% カゼイン溶液 (上記緩衝液で調整)

【0056】

【表7】

表 7

| 阻害剤               | 濃度 (mM) | 相対活性 (%) |
|-------------------|---------|----------|
| 無添加               | —       | 100      |
| DFP               | 1       | 62       |
|                   | 5       | 28       |
| PMSF              | 1       | 13       |
|                   | 5       | 10       |
| EDTA-2Na          | 1       | 80       |
|                   | 5       | 76       |
| PCMB              | 1       | 100      |
|                   | 5       | 97       |
| TPCK              | 1       | 94       |
|                   | 5       | 81       |
| TLCK              | 1       | 98       |
|                   | 5       | 93       |
| HgCl <sub>2</sub> | 1       | 87       |
|                   | 5       | 72       |

DFP : ジイソプロピルフルオロリン酸

PMSF : フェニルメタンスルフォニルフルオリド

EDTA-2Na : エチレンジアミンテトラアセテート-2Na

PCMB : バラククロマーキュリー安息香酸

TPCK : トシルフェニルアラニクロロメチルケトン

TLCK : トシルリシンクロロメチルケトン

【0057】表7から明らかなように、この発明に係る酵素はセリンプロテアーゼ阻害剤のジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) やフェニルメタンスルフォニルフルオリド (PMSF) による活性の阻害が、金属プロテアーゼ阻害剤のエチレンジアミンテトラアセテート-2Na (EDTA-2Na) やSHプロテアーゼ阻害剤のバラクロマーキュリー安息香酸 (PCMB) による活性の

阻害に比べ高いため、この発明に係る酵素は活性中心にセリン残基を持つセリンプロテアーゼであると推定される。

【0058】また動物起源のセリンプロテアーゼであるキモトリプシンの阻害剤、トシルフェニルアラニクロロメチルケトン (TPCK) 或はトリプシンの阻害剤、トシルリシンクロロメチルケトン (TLCK) によって

殆ど活性は阻害されないことが明かとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 この発明に係る酵素の精製過程を示すフローシート

【図2】 ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出曲線を示すグラフ

【図3】 高速液体クロマトグラフィーの溶出曲線を示すグラフ

【図4】 紫外線領域吸収スペクトルを示すグラフ

【図5】 分子量決定の際の検量線を示すグラフ

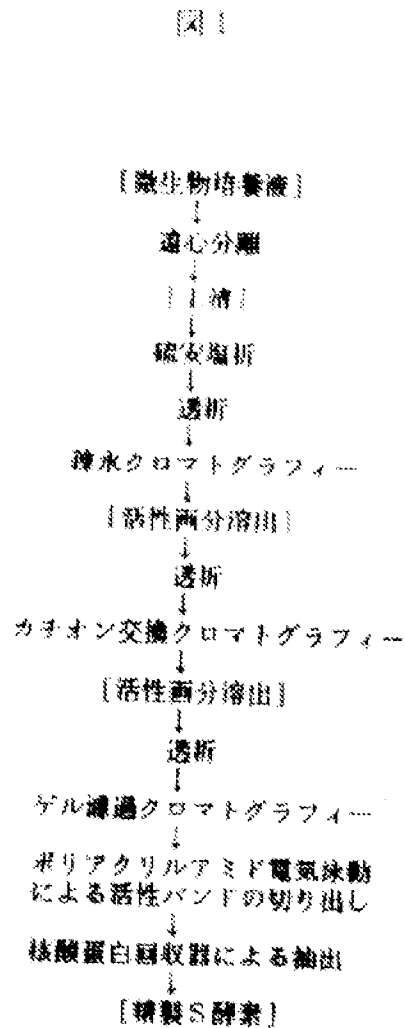
【図6】 実施例3で得られた酵素液の至適pHを示す図

【図7】 実施例3で得られた酵素液の安定pH範囲を示す図

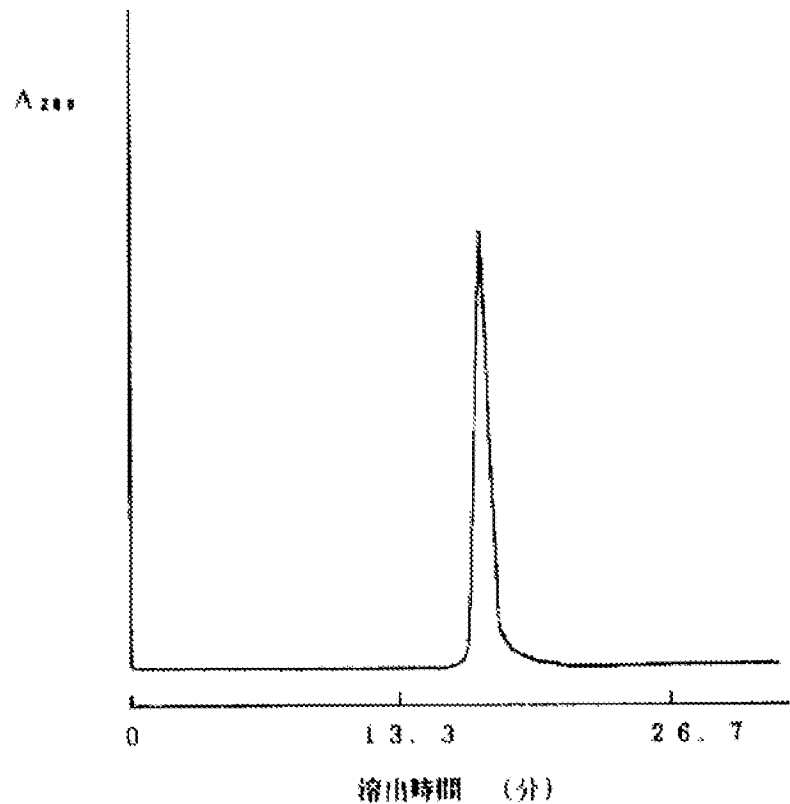
【図8】 実施例3で得られた酵素液の至適温度を示す図

【図9】 実施例3で得られた酵素液の耐熱性を示す図

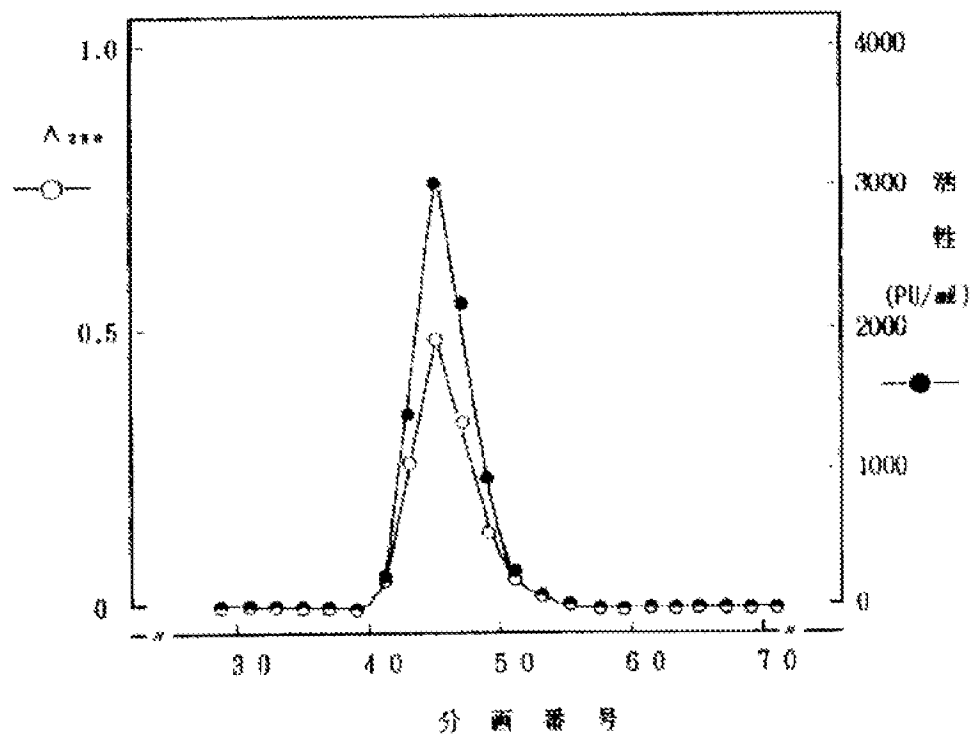
【図1】



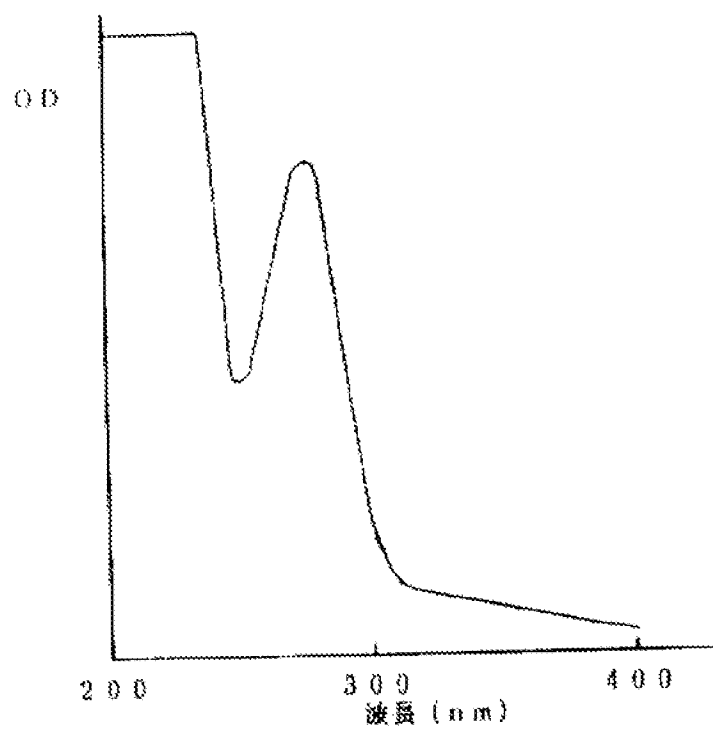
【図3】



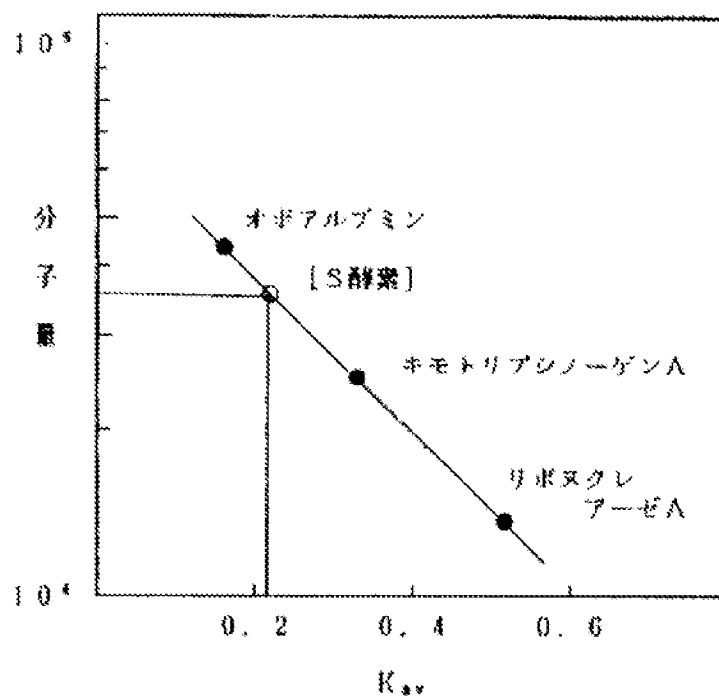
【図2】



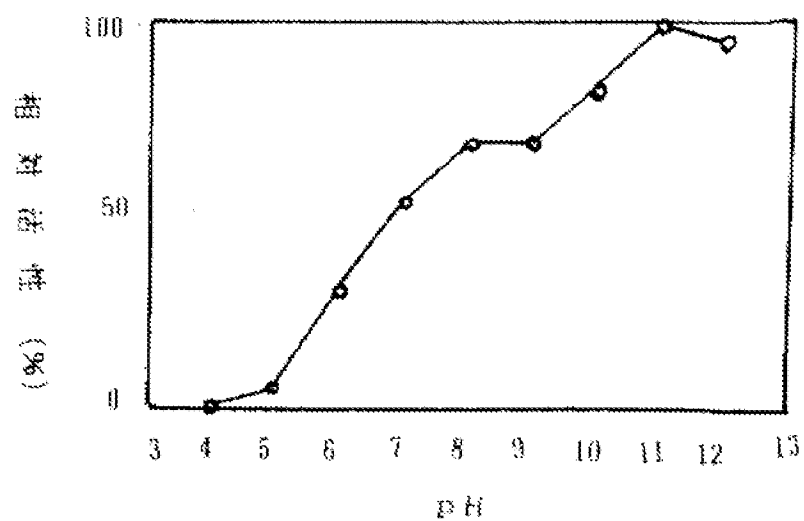
【図4】



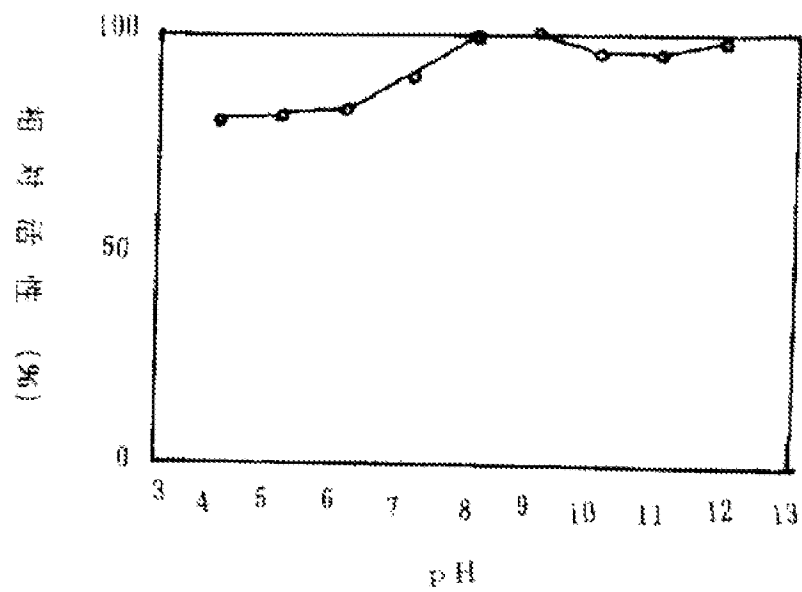
【図5】



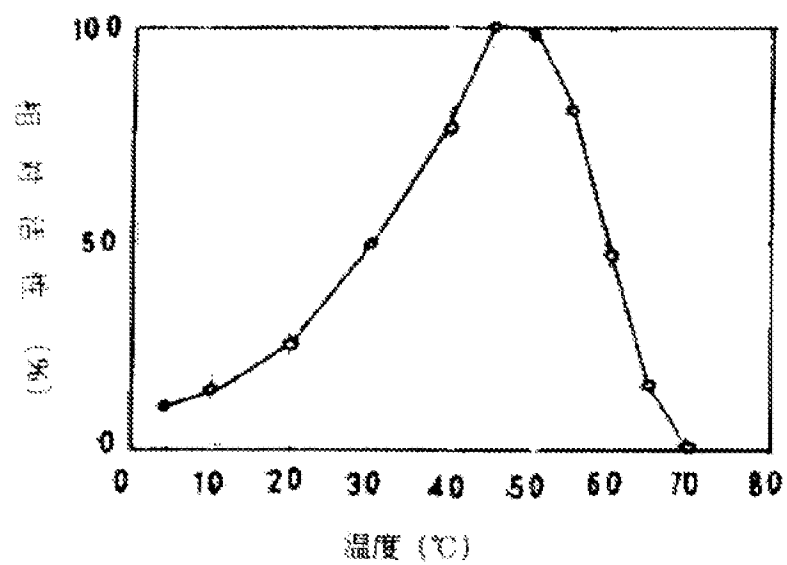
【図6】



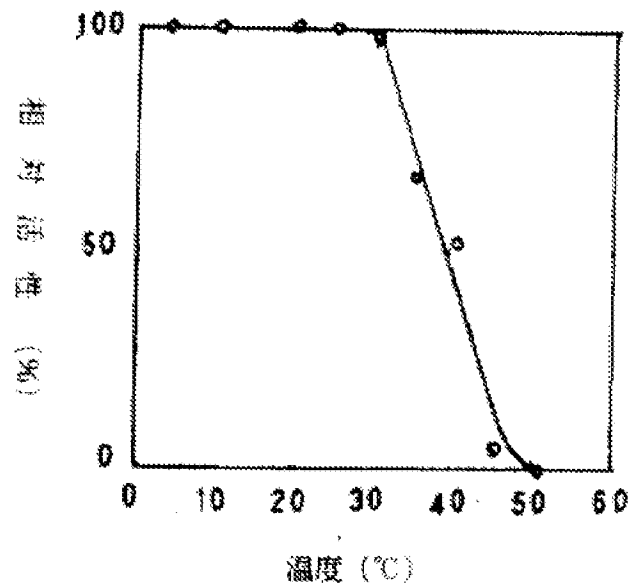
【图7】



【图8】



【図9】



---

フロントページの続き

(72)発明者 新村 洋一  
北海道網走市駒場5-71-1

(72)発明者 山屋 陽子  
北海道網走市南5条西4丁目